

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変の胆管病変発生における菌体成分の関与
—胆管系自然免疫におけるサイトカインネットワークおよびペルオキシソーム増殖因子
活性化受容体 γ の関与について—

分担研究者 中沼 安二 金沢大学形態機能病理学 教授

研究要旨: 原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病因または病態形成に菌体成分の関与が示唆されている。今回、胆管細胞と菌体成分との相互作用を検討したところ、ヒト胆管細胞における Toll-like receptor (TLR) 2~4 および MD-2 の発現、また IFN- γ (Th1 型) による TLR の発現亢進と菌体成分に対する感受性亢進が見られ、PBC の胆管炎発生に TLR を介した自然免疫機構と Th1 型サイトカインへの偏位が関与していることが示唆された。また、胆管細胞は抗炎症性因子であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ を発現し、IL-4 (Th2 型) 刺激にて PPAR γ の発現亢進が見られた。さらに PBC の肝組織内では胆管における PPAR γ の発現低下が見られ、胆管炎の増悪に関与していることが示唆された。最後に、PPAR γ リガンド刺激にて胆管細胞における NF- κ B の活性化を抑制することができ、PPAR γ リガンドが PBC の新たな治療薬として期待された。

研究協力者

原田憲一 金沢大学形態機能病理学 講師

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病因または病態形成に細菌感染症や菌体成分の関与が示唆されているが、細菌成分と胆管病変との関連性については不明である。今回我々は、胆管細胞と菌体成分との直接的な相互作用を検討するため、①ヒト胆管細胞における菌体成分認識受容体 Toll-like receptor (TLR) および関連分子 (MD-2) の発現と機能的解析、②サイトカイン環境の変化による TLR 発現と感受性の影響、③細胞内シグナル伝達の抑制分子であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ の発現について検討し、PBC 胆管炎の発生と胆道系自然免疫との関連性、さらに PBC の新たな治療法について考察した。

B. 研究方法

1. 培養細胞

培養細胞を用いた *in vitro* の検討は、ヒト肝内胆管癌由来培養細胞 2 株 (CCKS1 と HuCCT1)、ウイルス性慢性肝炎 (CVH) 患者由来培養胆管細胞 1 株 (BEC 1)、PBC 患者由来培養胆管細胞 2 株 (BEC 2, BEC 3) を使用した。

2. 肝組織材料と免疫組織化学的染色

PBC (組織学的病期 1~3 期) 11 例, CVH 10 例, 肝外閉塞性黄疸 7 例, 正常肝 9 例のホルマリン固定

パラフィン包埋切片を対象に、PPAR γ 抗体 (Santa Cruz) を用いた Envision 法 (Dako) にて免疫組織化学的染色を行った。

3. Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) 法

培養細胞における TLR と関連分子および PPAR γ の発現を検討するため、細胞から全 RNA を抽出し、型の如く RT-PCR 法にて TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, MD2, PPAR γ mRNA を検出した。

4. Nuclear factor (NF)- κ B-DNA binding assay

菌体成分に対する反応性を細胞内シグナルの主要伝達分子である NF- κ B の活性化にて評価した。菌体成分刺激後の培養細胞から核成分のみを抽出し、活性化 NF- κ B とコンセンサス DNA との結合能を測定した。

5. TLR リガンドとサイトカインによる刺激

TLR のリガンドとして主要菌体成分であるペプチドグリカン (TLR2 リガンド) およびリポポリサッカライド (LPS) (TLR4 リガンド) を用い、各 1 μ g/mL の濃度で培養上清に添加し刺激を行った。また、リコンビナントサイトカイン IL4, IL6, IFN- γ , TNF- α を用い、各 1000U/mL の濃度で培養上清に添加した (なお、培養細胞はこれらのサイトカイン受容体を有することを確認済み)。刺激後 1 時間目および 3 時間目の培養細胞を各々 NF- κ B-DNA binding assay と RT-PCR 解析に供した。

6. IFN- γ , PPAR γ リガンドによる前処置

IFN- γ および PPAR γ の内因性リガンド (15d-deoxy-prostaglandinJ2, 15d-PGJ2) で、各々

36 時間と 4 時間前処置後、ペプチドグリカンや LPS に対する感受性の変化を NF- κ B の活性化にて評価した。

C. 研究結果

1. サイトカインによる TLR 発現の変化

RT-PCR 法により、今回用いたすべての培養細胞に TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, MD-2 mRNA の発現を認めた。また、サイトカイン(1000 U/ml)刺激による TLR および MD2 mRNA 発現の挙動をリアルタイム PCR で検討したところ、IFN- γ は、TLR2 mRNA 発現を 3.5 倍に、TLR3, TLR4, TLR5 の発現を 2.0~2.3 倍に亢進させた。また、TNF- α は TLR2 を 3.9 倍に発現亢進させた。その他のサイトカイン刺激では、明らかな TLR 発現の変化は認めず、また、MD-2 発現はいかなるサイトカインでも変化しなかった。

2. IFN- γ 刺激による TLR 感受性の変化

培養胆管細胞を IFN- γ (1000 U/ml) で 36 時間前処理後、ペプチドグリカン(10 μ g/mL) または LPS(1 μ g/mL) 刺激による NF- κ B の活性化を測定した結果、IFN- γ は菌体成分刺激による NF- κ B の活性化を相乗的に亢進させた。

3. 肝組織内における PPAR γ の発現

正常肝における PPAR γ の発現は、主に肝細胞と胆管細胞の細胞質にみられ、肝細胞ではしばしば核にも発現を認めた。小葉間胆管における PPAR γ 発現は、肝細胞に比し強くみられたが、PBC の障害胆管ではしばしば肝細胞より発現が低下していた。このような PPAR γ 発現の低下を示す小葉間胆管の頻度は、正常肝で 5%、CVH で 7%、閉塞性黄疸で 12% 程度であったが、PBC では 35% の胆管に PPAR γ の発現低下が見られた。

4. サイトカインによる PPAR γ 発現の変化

BEC1, BEC2, BEC3 の 3 種の培養細胞を対象にサイトカイン(1000 U/ml) で 3 時間刺激後、PPAR γ mRNA 発現をリアルタイム PCR で評価したところ、IL4 は PPAR γ mRNA 発現を 16 倍に、IL6 は 4.3 倍に亢進させたが、IFN- γ や TNF- α 刺激では明らかな PPAR γ 発現の変化は認めなかった。

5. PPAR γ リガンドによる TLR 感受性の変化

PPAR γ リガンド(15d-PGJ2) で 4 時間前処置後、ペプチドグリカンまたは LPS に対する反応性を NF- κ B の活性化で評価した結果、PPAR γ リガンドの前処置にてペプチドグリカン、LPS に対する反応性が各々 51%、54% にまで抑制された。

D. 考察

TLR を介した自然免疫機構はマクロファージなどの免疫担当細胞のみならず腸管上皮などの上

皮細胞も有しており、特にクローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患では自然免疫の破綻または異常が病態形成に参与していることが明らかとなっている。また、サイトカインは炎症反応、T 細胞および B 細胞の活性化と分化、抗体産生などに参与し、特に自己免疫性疾患の発生、進展に重要な役割を果たす。近年、CD4 陽性 T 細胞はその産生するサイトカインパターンにより Th1 型と Th2 型に大別され、Th1/Th2 バランスの異常が自己免疫疾患の病態形成に関連していることが明らかとなっている。PBC の障害胆管周囲では Th1 型サイトカインが優位な状態と考えられており、Th1 型サイトカインが細胞障害性 T 細胞の分化、誘導を促し、胆管障害に参与していることが示唆されている。今回の検討にて、ヒト胆管細胞は、TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, MD-2 を発現しており、TLR2 および TLR4 のリガンドであるペプチドグリカンおよび LPS に対する反応性も NF- κ B の活性化にて確認できた。また、胆管細胞における TLR の発現は Th1 型サイトカインマーカーである IFN- γ にて亢進し、また TLR リガンドに対する感受性も亢進した。このことより PBC の胆管周囲での Th1 型サイトカインへの偏位は、胆管細胞における菌体成分に対する感受性を亢進させ、NF- κ B の活性化を介した炎症性サイトカインの産生亢進が胆管炎の発生に加担していると推測された。

PPAR γ は、主に脂肪細胞分化と糖代謝に関わるステロイドホルモン核内受容体スーパーファミリーに属する核内転写因子である。PPAR γ は脂肪組織に高発現しているが、肝臓などの免疫系臓器や副腎、腸管にも分布している。リガンドは、糖尿病治療薬として使用されたチアゾリジン誘導体 (Troglitazone) の他、内因性リガンドとしてアラキドン酸カスケードの prostaglandin 代謝産物 (15d-PGJ2) が知られている。これらのリガンドはマクロファージ、単球、上皮細胞に作用して、NF- κ B, mitogen activated protein kinase (MAPK) や activator protein-1 (AP-1) などの細胞内転写因子の活性化を抑制することにより抗炎症作用を示す。近年、潰瘍性大腸炎の腸管上皮で PPAR γ 発現の低下が見られること (Dubuquoy ら, Gastro- enterology, 2003) が報告され、PPAR γ による抗炎症作用の低下が疾患の病態形成に参与していると推測されている。今回我々は、胆管細胞に PPAR γ の発現があり、また、IL-4 (Th2 型) 存在下にて PPAR γ の発現が増強することを示した。このことより PBC の胆管周囲における Th1 優位な環境、すなわち Th2 劣勢な状態では胆管細胞における PPAR γ の発現が抑制されていると推測

される。事実、今回の免疫組織化学的検討にて、PBCの胆管ではPPAR γ 発現の低下が対照群に比し多く認められ、PPAR γ による抗炎症作用が低下していると推測された。また、腸炎や関節リウマチの実験動物モデルを用いた検討で、PPAR γ リガンドがこれらの動物の症状を軽減することが報告されている(Wadaら, Trends Mol Med, 2001、Kawahitoら, J Clin Invest, 2000)。今回、内因性PPAR γ リガンドである15d-PGJ2を培養胆管細胞に作用させたところ、菌体成分刺激に対するNF- κ Bの活性化が抑制された。この所見よりPPAR γ リガンドがPBCの胆管炎を軽減させることが示唆され、PBCの新たな治療薬として利用できる可能性が挙げられた。

E. 結論

今回の検討より、ヒト肝内胆管系における自然免疫機構の制御に胆管周囲のサイトカインネットワークおよびPPAR γ が関与していることが示唆され、異常な自然免疫現象がPBCの胆管病変形成に加担していると推測された。また、PPAR γ リガンドがPBCの新たな治療薬として期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harada K, Ohira S, Isse K, Ozaki S, Zen Y, Sato Y, Nakanuma Y. Lipopolysaccharide activates nuclear factor- κ B through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. Lab Invest. 2003 83(11):1657-67.

2. 学会発表

- 1) 原田憲一, 一瀬久美子, 太平周作, 中沼安二
胆管細胞のリポポリサッカライド反応性における胆汁酸の影響、第16回西日本臨床胆汁酸研究会、平成15年6月
- 2) 原田憲一, 一瀬久美子, 中沼安二
胆管細胞におけるヒト β -defensin2の発現機序、第29回日本病理学会総会、平成15年4月

- 3) 原田憲一, 一瀬久美子, 佐藤保則, 中沼安二
胆管上皮細胞におけるToll-like receptor 4の発現調節機構-培養系を用いた検討-
第39回日本肝臓学会総会、平成15年5月
- 4) 原田憲一, 尾崎聡, 一瀬久美子, 中沼安二
菌体成分による培養胆管細胞での誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現誘導
第39回日本肝臓学会総会、平成15年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

ヒト肝細胞 Toll-like receptor 4 (TLR4) 発現に関する研究

分担研究者 右田 清志 国立長崎医療センター臨床研究センター 免疫研究部長

研究要旨： Lipopolysaccharide (LPS)の肝細胞に対する直接作用の有無を検討する目的で、正常ヒト肝細胞における TLR4 の発現を調べた。ヒト肝細胞は、TLR4 を mRNA、蛋白レベルで発現していた。さらにヒト肝細胞を LPS で刺激すると、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化、IkappaB- α の分解が誘導され、急性期蛋白である SAA の産生が認められた。以上の結果より、LPS は肝細胞に対する直接作用も有していることが示唆された。

A. 研究目的

グラム陰性桿菌の菌体成分である Lipopolysaccharide (LPS)は、エンドトキシンとも称され、敗血症性ショックなどの感染症に加え、肝不全状態でも上昇し、肝障害を誘発することが知られている。LPS による肝障害の成立機序として、Kupffer 細胞、肝マクロファージを介した、サイトカインなどの炎症分子の産生が考えられている。近年、病原体認識分子である Toll 様受容体 (TLRs) が、菌体成分に対する免疫応答に重要な役割を果たしていることが明らかにされておりマウス肝細胞での TLRs の発現も報告されている。今回、LPS 認識分子である TLR4 のヒト肝細胞での発現、および LPS の肝細胞に対する作用について検討した。

B. 研究方法

正常ヒト肝細胞 (cell system 社より入手) での、TLR4 mRNA の発現は RT-PCR で、TLR4 蛋白発現は、フローサイトメーターを用いた免疫染色で検討した。ヒト肝細胞を LPS で刺激し、肝細胞の血清アミロイド A 蛋白 (SAA) mRNA の発現は RT-PCR で、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性は、リン酸化 MAPK 抗体を用いたイムノブロットで検討した。肝細胞の SAA 蛋白産生は、培養上清中の SAA をイムノブロットで測定し検討した。

C. 研究結果

ヒト肝細胞は恒常的に TLR4 mRNA を発現していた。また肝細胞はその細胞表面に TLR4 を発現していたが、LPS 刺激、TNF- α などのサイトカイン刺激でその発現は変化しなかった。ヒト肝細胞を LPS で刺激すると、ERK1/2、p38、JNK1/2 のリン

酸化がみられ MAPK が活性化されることが判った。また肝細胞を LPS で刺激すると、IkappaB- α の degradation が見られることより、NF- κ B の活性化がおこなっていることが示唆された。さらに LPS 刺激により、肝細胞に acute-phase SAA である SAA1、SAA2 の mRNA の発現が誘導され、培養上清への SAA 産生も確認された。

D. 考察

今回の検討でヒト肝細胞は病原体認識分子である TLR4 を発現しており、TLR4 のリガンドである LPS の刺激で細胞内にシグナルが伝達されること、肝細胞特異的蛋白である SAA が産生されることが判った。SAA には、炎症細胞の遊走、マトリックスメタロプロテアーゼの誘導など炎症惹起作用があり、LPS による SAA 産生は肝障害に関与している可能性も考えられた。以上のことより、LPS による肝障害の成立機序として、Kupffer 細胞、マクロファージを介した炎症メディエーターの産生に加え、TLR4 を介した肝細胞への直接作用の存在が示唆された。

E. 結論

ヒト肝細胞は、LPS 認識分子である TLR4 を発現しており、LPS 刺激で、肝細胞は急性期蛋白である SAA を産生することが判った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「PBCにおけるWntシグナル伝達経路の解析およびその臨床応用」に関する臨床研究

分担研究者 田中 篤 帝京大学医学部内科 講師

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis; PBC）における胆管上皮細胞障害の機序は不明である。我々は以前、胆管障害にWntシグナルがかかわっている可能性を見出した。本研究では、PBCにおけるWntシグナル伝達系の関与を明らかにし、画期的治療法の開発に資することを目的とする。初年度は移植患者から得られたPBC肝（n=7）、および対照としてPSC（n=3）・HCV肝（n=4）、さらに大腸癌肝転移などから得られた正常肝（n=5）を検体として用い、これらからRNAを抽出、cDNAに変換後、real-time PCR（LightCycler, Roche Diagnostics）によってWnt2B遺伝子を定量し、各疾患における発現を比較した。その結果、対照肝と比較し、Wnt2B遺伝子はPBC肝において過剰発現しており（PBC vs normal, $p=0.0429$; PBC vs HCV, $p=0.0233$; PBC vs PSC, $p=0.0147$ ）、PBCの病態形成にWnt遺伝子が関与している可能性が改めて確認された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（primary biliary cirrhosis; PBC）は肝内の胆管上皮細胞が特異的に障害される疾患であるが、障害の機序は不明である。我々は以前、PBCの胆管上皮細胞でWnt2B遺伝子が過剰発現していることを見出したが、これは胆管障害にWntシグナルがかかわっている可能性を示唆している。本研究では、PBCにおけるWntシグナル伝達系の関与を明らかにし、ひいてはWntシグナル伝達系を操作することがPBCの画期的治療法になりうるか否か検討することを目的とする。本年度は当研究の初年度として、多数の検体を用い、Wnt2B遺伝子がPBC肝において過剰発現していることを確認することを目的とした。

B. 研究方法

移植患者から得られたPBC肝（n=7）、および対照としてPSC（n=3）・HCV肝（n=4）、さらに大腸癌肝転移などから得られた正常肝（n=5）を検体として用いた。これらからRNAを抽出、cDNAに変換後、real-time PCR（LightCycler, Roche Diagnostics）によってWnt2B遺伝子を定量し、各疾患における発現を比較した。

（倫理面への配慮）

臨床検体を採取する際には患者に対してインフォームドコンセントを行い、当該研究に用いる旨承諾を得た。なお、当研究は遺伝子解析を伴うものであり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する

倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従って行われている。

C. 研究結果

対照肝と比較し、Wnt2B遺伝子はPBC肝において過剰発現していた（PBC vs normal, $p=0.0429$; PBC vs HCV, $p=0.0233$; PBC vs PSC, $p=0.0147$ ）。

D. 考察

Wnt2Bは細胞外に分泌される蛋白質で、細胞表面のレセプターによりそのシグナルを細胞内へ伝達する。今後、WntのレセプターがPBC肝のどの細胞に発現しているかを解析するとともに、その下流に存在するGSK-3 β 、 β -cateninなどの分子を解析することにより、Wntシグナルが活性化されていることを明らかにする必要がある。

E. 結論

多数例での検討で、PBC肝においてWnt2B遺伝子が過剰発現していることが明らかとなり、PBCの病態形成にWntシグナルが関与している可能性が改めて確認された。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

論文・学会いずれも未発表である。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

ない

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変の肝内リンパ球に関する研究

分担研究者 市田 隆文 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 助教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）の治療を考える上で移植に至る進行例と非進行例の鑑別は重要であり、生体肝移植を施行した症候性 PBC7 例と、腹腔鏡下肝生検を施行した無症候性 PBC11 例を対象として標的臓器である肝臓内のリンパ球解析を行った。無症候性症例と比較して、移植例では CTLA-4 及び FasL を発現した活性化 CD56 陽性 NKT 細胞が有意に増加し免疫組織染色上も FasL 陽性単核球の浸潤が認められることを、同一症例の病初期と移植時においても確認した。PBC の進行には NKT 細胞による Fas-FasL 系を介した肝細胞、胆管上皮細胞の傷害が関与している可能性があり、その制御が新たな治療法となりうるか今後検討したいと考えている。

共同研究者：

新潟大学医歯学総合病院第三内科
山際 訓、石本結子、宮川亮子
同第一外科 佐藤好信
新潟大学医歯学総合研究科医動物・免疫学
富山智香子

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病因として、ミトコンドリア抗原や胆管に対する自己免疫反応、特にミトコンドリア抗原に対する自己反応性リンパ球の活性化や clonal expansion が何らかの役割を果たしていることが強く示唆されている。しかしながら、無症候性 PBC 症例が多数存在することを考慮すると、PBC 病態の進展のためには、他のさまざまな因子の関与が必要と考えられる。その様な病態持続・進行因子として、自然免疫による病態修飾の可能性が示唆されている。

PBC の標的臓器である肝臓には natural killer (NK) 細胞や natural killer T (NKT) 細胞など自然免疫応答の中心となるリンパ球が豊富に局在しており、末梢血や他臓器とは異なる免疫環境が構築されている。本研究においては、無症候性 PBC 症例と生体肝移植に至った症候性 PBC 症例の肝臓内リンパ球、特に NK 細胞と NKT 細胞の比較解析を行うことにより、自然免疫応答による PBC 病態修飾の可能性について検討することを目的とし、最終的に自然免疫応答の制御による PBC 進展阻止を目指した新たな治療法の開発を目的としている。

表 1. 生体肝移植症例

No.	年齢	性別	Scheuer	T. Bil	ALP	IgM	初発から移植(年)	初発時年齢
1	52	M	IV	17.9	536	642	15	37
2	59	F	IV	12.0	1117	566	11	48
3	48	F	IV	4.3	290	657	13	35
4	48	F	IV	12.8	558	1260	14	34
5	60	F	IV	7.5	647	507	14	46
6	46	M	IV	7.5	682	322	14	32
7	47	F	IV	22.5	658	674	11	36
Avg.	51.4			12.1	641.1	659.0	13.1	38.3
STD	5.4			5.9	229.8	290.6	1.5	5.7

表 2. 無症候性 PBC 症例

No.	年齢	性別	Scheuer	T. Bil	ALP	IgM
1	64	F	II	0.7	536	290
2	42	M	I	0.4	282	377
3	29	F	I	0.4	319	258
4	62	F	II	0.4	369	209
5	54	F	I	1.0	241	240
6	75	F	II	0.7	261	576
7	58	F	I	1.4	306	474
8	62	M	I	0.4	546	213
9	56	F	I	0.6	445	655
10	70	F	I	0.4	458	90
11	54	F	I	0.9	491	344
Avg.	56.9			0.7	386.7	380.3
STD	12.1			0.3	107.2	147.6

B. 研究方法

1. 対象

1999年3月から2003年12月の間に新潟大学医学総合病院において、十分なインフォームドコンセントを得た上で生体肝移植を施行したPBCレシピエント7例 (symptomatic PBC) とそのドナー7例 (control)、ならびに診断目的に針生検を施行した無症候性PBC症例11例 (asymptomatic PBC) を対象とした。

生体肝移植レシピエントは男性2名、女性5名で移植時の平均年齢は51.4歳、何らかの肝機能異常を指摘された初発時年齢は38.3歳と若年で発症した症例が多く、初発から移植まで平均13.1年の経過であった (表1)。

無症候性PBC症例は男性3名、女性8名で、平均年齢は56.9歳。組織学的病期分類 (Scheuer分類) ではI期が8例、II期が3例であった (表2)。

生体肝移植ドナーは男性7名で、平均年齢は22.3歳だった。

2. フローサイトメトリーによる解析

移植症例は肝臓を細切後、コラゲナーゼ処理しFicoll-Paqueによる比重遠心法にて単核球を分離した。針生検組織はステンレスメッシュ上ですり潰して細胞浮遊液とし、末梢血はFicoll-Paqueによる比重遠心法で単核球を分離した。末梢血および肝臓から得られた単核球を各種モノクローナル抗体で三重染色後、FACScanによる解析を行った。

3. 免疫組織染色

肝組織はABC法を用いた免疫組織染色により、Fas Ligand (FasL) の発現について検討した。

C. 研究結果

1. 肝臓内NK、NKT、およびT細胞比率の変化

NKマーカーとしてCD56、CD57、CD161を用いてNK、NKT、T細胞を分画し、無症候性PBC症例とレシピエントPBC症例とで比較を行った。無症候性PBC症例の肝臓中では、正常肝に比しT細胞比率の有意な増加 ($p < 0.01$) と、NK細胞比率の有意な減少 ($p < 0.05$) が認められたのに対し、肝移植に至った症候性PBC症例の肝臓中では、無症候性PBC症例で減少していたNKT細胞比率の有意な増加 ($p < 0.05$) と、T細胞比率の減少傾向が認められた (図1)。また、CD4陽性細胞は病期の進行とともに増加が認められた。これら結果から、無症候性PBC症例におけるT細胞特にCD4陽性細胞の関与と、症候性症例におけるNKT細胞関与の可能性が示唆された。

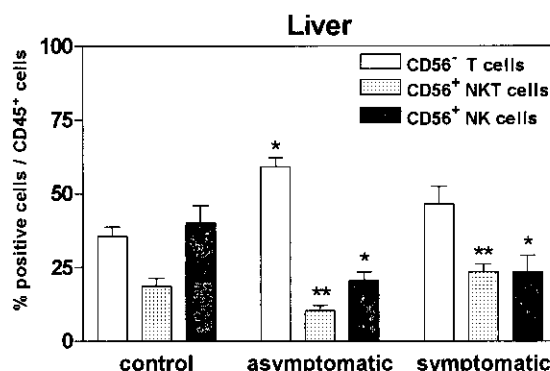


図1. 肝組織中CD45陽性細胞中のT細胞 (CD56陰性CD3陽性)、NKT細胞 (CD56陽性CD3陽性) およびNK細胞 (CD56陽性CD3陰性) 比率。CD3、CD56、CD45にて三重染色を行い、CD45陽性細胞のみを解析した。* $p < 0.01$ (compared to control), ** $p < 0.05$

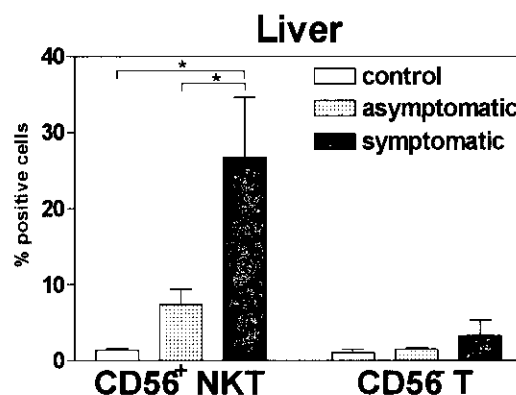


図2. 肝臓中および末梢血中のCD56陽性NKT細胞とT細胞 (CD56陰性CD3陽性) 分画におけるFasL陽性比率。CD3、CD95L、CD56にて三重染色を行い、各分画における陽性率を解析した。* $p < 0.01$

2. NKT細胞、T細胞におけるco-stimulatory moleculeとFas ligand (FasL) 発現

NKT細胞におけるCD28発現は、無症候性PBC症例と肝移植に至った症候性PBC症例ともに発現の有意な低下が認められた ($p < 0.01$)。肝移植に至った症候性PBC症例ではCTLA-4を発現し活性化したCD56陽性NKT細胞が有意に増加しており ($p < 0.01$)、また、FasLの発現割合も有意に増加していた ($p < 0.01$) (図2)。

3. 免疫組織染色によるFasL発現

免疫組織染色上も、肝移植に至った症候性PBC症例の肝臓中でFasL陽性単核球の浸潤が認められた。

移植症例の中で、初発時（診断時）の肝生検組織が検討可能であった症例が2例あり、どちらの症例も無症候期には FasL 陽性細胞は認められなかったのに対し、移植時には FasL 陽性細胞の浸潤が認められた。以上のように、免疫組織染色においても無症候期には認められなかった FasL 陽性細胞の浸潤を肝移植時に確認し、特に同一症例においても確認した。

D. 考察

PBC の治療を考える上で移植に至る進行例と非進行例の鑑別は重要である。PBC の病因としては、ミトコンドリア抗原に対する自己反応性リンパ球の活性化や clonal expansion が何らかの役割を果たしていることが強く示唆されているが、無症候性 PBC 症例が多数存在することを考慮すると、PBC 病態の進展のためには、他のさまざまな因子の関与が必要と考えられる。そのような PBC 病態の持続・進展因子として、自然免疫による病態修飾の重要性が示唆されている。Tsuneyama らは PBC における障害小胆管上皮ならびに類上皮肉芽腫における CD1d 発現の亢進を報告し、NKT 細胞を介した類上皮肉芽腫形成の可能性を指摘した (Tsuneyama K et al. Hepatology 28:620, 1998.)。また、Kita らは PBC 肝組織にて対照肝に比し NKT 細胞が増加していると報告している (Kita H et al. Gastroenterology 123: 1031, 2002.)。本研究において行った肝臓内のリンパ球解析においても、無症候性症例と比較して、肝移植に至った症候性症例では CTLA-4 及び FasL を発現した活性化 CD56 陽性 NKT 細胞が有意に増加しており、免疫組織染色上も FasL 陽性単核球の浸潤が認められることを、同一症例の病初期と移植時においても確認した。そのような NKT 細胞の活性化には、CD4 陽性 T 細胞からの Th1 サイトカインや、うっ滞胆汁由来菌体成分 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) などの関与が推測される。特に PAMPs について、マウスのサルモネラ感染に伴う肝障害においては、toll-like receptor 2 (TLR2) を介して FasL 発現の増加した NKT 細胞が関与していることが報告されており (Shimizu H et al. Gastroenterology 123: 1265, 2002.)、PBC の進行にも TLR2 を介して FasL 発現の増加した NKT 細胞による Fas-FasL 系を介した肝細胞、胆管上皮細胞の傷害が関与している可能性がある。肝移植症例において認められた CD56 陽性 NKT 細胞や CD57 陽性 NKT 細胞などの NKT 細胞活性化をもたらす機構の解明には、1) Th1 サイトカイン、IP-10 などケモカインの測定など、T 細胞応

答との関連の検討、2) NKT 細胞における toll-like receptor (TLR) 発現の検討が重要であり、また 3) FasL を中心とした NKT 細胞の関与する細胞障害機構の解析も必要である。以上のように PBC 病態進展への自然免疫応答活性化の関与について検討し、活性化因子の同定とその制御による進展抑制の可能性について今後検討したいと考えている。

E. 結論

原発性胆汁性肝硬変の標的臓器である肝臓内のリンパ球解析により、無症候性症例と比較して、肝移植に至った症候性症例では CTLA-4 及び FasL を発現した活性化 CD56 陽性 NKT 細胞が有意に増加しており、免疫組織染色上も FasL 陽性単核球の浸潤が認められることを、同一症例の病初期と移植時においても確認した。PBC の進行には FasL を発現した NKT 細胞による Fas-FasL 系を介した肝細胞、胆管上皮細胞の傷害が関与している可能性があり、その制御が新たな治療法となりうるか今後検討したいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山際訓、市田隆文. C 型慢性肝疾患における肝臓内リンパ球の変動、B 型・C 型肝炎の病態と治療、犬山シンポジウム記録刊行会編、アークメディア、東京、2003 年、pp101-108.
- 2) 楊秀華、市田隆文、山際訓、菅原聡、石川達、佐藤好信、渡部久実、安保徹、朝倉均. 肝細胞癌周囲非癌部に増加する CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の解析、消化器と免疫 No39、2002、朝倉均監修、マイライフ社、東京、2003 年、124-126 頁.
- 3) Sato Y, Ichida T, Watanabe H, Yamamoto Oya H, Nakatsukasa H, Kobayashi T, Watanabe T, Kameyama H, Hatakeyama K. Repeated intraportal donor specific transfusion may induce tolerance following adult living related donor liver transplantation. Hepato-Gastroenterol 2003; 50: 601-606.
- 4) Sato Y, Ichida T, Yamamoto S, Oya H, Nakatsukasa H, Kobayashi T, Watanabe T, Kameyama H, Hatakeyama K. Analysis of microchimerism in peripheral blood by short tandem repeated sequences immediately after living related liver transplantation.

Transplant Proc., 2003; 35(1): 412-413.

- 5) Takeishi T, Sato Y, Ichida T, Yamamoto S, Kobayashi T, Hatakeyama K. Short-term outcomes of living-related liver transplantation for primary biliary cirrhosis and its recurrence: report of five cases. Transplant Proc., 2003; 35(1): 372.
- 6) Sato Y, Ichida T, Yamamoto S, Hirano K, Kobayashi T, Oya H, Nakastukasa H, Watanabe T, Hatakeyama K. Shear stress theory and small-for-size graft in adult living related liver transplantation. Transplant Proc., 2003; 35(1): 78.

2. 学会発表

- 1) 生体肝移植症例における原発性胆汁性肝硬変の肝内リンパ球解析. 石本結子, 市田隆文, 山際訓, 佐藤好信, 渡部久実, 安保徹, 青柳 豊. 第 39 回日本肝臓学会総会. 2003 年 5 月 22 日. 於福岡.
- 2) 生体肝移植症例における原発性胆汁性肝硬変の肝内リンパ球解析. 石本結子, 市田隆文, 山際訓, 佐藤好信, 渡部久実, 安保徹, 青柳 豊. 第 17 回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 2003 年 12 月 14 日. 於東京.
- 3) Interferon + Ribavirin 併用療法前後における肝臓内リンパ球の変動. 山際 訓, 市田隆文, 大越章吾, 石本結子, 楊 秀華, 渡部久実, 安保 徹, 青柳 豊. 第 17 回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 2003 年 12 月 14 日. 於東京.
- 4) Serial phenotypic profiling of intrahepatic lymphocytes in patients with chronic hepatitis C before and after combination interferon α -2b and Ribavirin therapy. Yamagiwa S, Ichida T, Okoshi S, Yang XH, Ishimoto Y, Genda T, Matsuda Y, Abo T, and Aoyagi Y. 第 54 回米国肝臓学会総会. 2003 年 10 月 26 日. 於米国ボストン.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変の病態に関与する T 細胞の機能解析

分担研究者 下田 慎治 九州大学大学院病態修復内科学 助手

研究要旨：本研究の目的は、PBC の病態に関与する T 細胞の機能解析である。本年度は 1. 抗ミトコンドリア抗体の対応抗原である PDC-E2 抗原の T 細胞エピトープの同定 2. PDC-E2 反応性 T 細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性 3. PBC 患者、および健常者から樹立される PDC-E2 反応性 T 細胞クローンの質的差異についての検討 4. 抗原提示された後の T 細胞クローンについての検討 5. 末梢血中の PDC-E2 反応性 T 細胞の頻度を検討した。その結果 1. T 細胞は HLA DR53 拘束性にリポ酸結合部位に含まれる 163-176 番を最小抗原として認識すること、2. gp210 抗原の一部に PDC-E2 163-176 反応性 T 細胞クローンが交差反応性を示すこと、3. PBC 患者由来の PDC-E2 反応性 T 細胞は側副刺激分子非依存性であり健常者由来の PDC-E2 反応性 T 細胞は側副刺激分子依存性であること、4. 側副刺激分子依存性 T 細胞は anergy 状態になりやすいこと、5. PBC 患者からは側副刺激分子非依存性の PDC-E2 反応性 T 細胞が多く同定され、健常者からは側副刺激分子依存性の PDC-E2 反応性 T 細胞が多く同定されることが判明した。以上本年度の研究により、PBC 患者、健常者での PDC-E2 163-176 反応性 T 細胞の性質の差異が明らかになった。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）は肝臓内小細胆管のリンパ球浸潤による破壊から肝硬変へ至り、究極的には肝臓移植でしか救命し得ない抗ミトコンドリア抗体の出現を特徴とする厚生労働省指定の難病である。疾患の進展に自己免疫機序が考えられているものの、病因や進展を規定する因子は明らかにされておらず、またそのため根治的な治療法も開発されていない。免疫応答機序を解明することは本疾患の病態の理解、ひいては治療法の開発につながるものと考えられる。本研究の目的は、PBC の病態に関与する T 細胞の機能解析である。

B. 研究方法

1. 抗ミトコンドリア抗体の対応抗原である PDC-E2 抗原の T 細胞エピトープの同定

560 アミノ酸残基からなる PDC-E2 を網羅するよう 20 アミノ酸残基からなる合成ペプチドを多数作成し、PBC 患者末梢血由来の T 細胞との反応性を検討し、最終的に最小エピトープを用いて T 細胞クローンの樹立を試みた。

2. PBC 患者より樹立した PDC-E2 反応性 T 細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性

今までに PBC 患者で出現することが報告され

ている抗核抗体に対応するヒト核タンパク（NUP214, SP100, Centromere protein C, GP210, Lamin B Receptor, Nuclear pore glycoprotein p62）由来のペプチドを多数作成し、PDC-E2 反応性 T 細胞クローンとの交差反応性を検討した。

3. PBC 患者、および健常者から樹立される PDC-E2 反応性 T 細胞クローンの質的差異についての検討

PDC-E2 反応性 T 細胞クローンは PBC 患者からのみならず健常者からも樹立されたが、その質的差異を検討する目的で、抗原提示細胞として自己末梢血由来の単核球細胞（PBMC）、あるいは PDC-E2 抗原が拘束される HLA DR53 分子だけを遺伝子導入したマウス線維芽細胞（L-DR53）、あるいは HLA DR53 陽性患者で施行された移植肝臓由来の胆管上皮細胞（BEC）を抗原提示細胞（APC）として用いて、PDC-E2 反応性 T 細胞クローンの増殖性を検討した。

4. 抗原提示された後の T 細胞クローンについての検討

PBMC、L-DR53、BEC を APC とした後の PDC-E2 反応性 T 細胞クローンを回収し、再度 PBMC で抗原提示した際の T 細胞クローンの増殖反応を検討した。

5. PBMC、あるいはL-DR53を抗原提示細胞に用いた場合の末梢血中のPDC-E2反応性T細胞の頻度
PBC患者あるいは健常者の末梢T細胞をPDC-E2抗原で感作したPBMC、あるいはL-DR53をAPCとして刺激し、最終的に限界希釈法を用いて抗原反応性T細胞の頻度を算出した。

C. 結果と考察

1. 抗ミトコンドリア抗体の対応抗原であるPDC-E2抗原のT細胞エピトープの同定

PBC患者の末梢血にはPDC-E2抗原に反応するCD4陽性T細胞が存在し、このT細胞はHLA DR53拘束性にリポ酸結合部位に含まれる163-176番を最小抗原として認識した(図1)。170番のE、172番のD、173番のK(ExDK)配列、あるいは168番のE、169番のI、170番のE、172番のD(EIExD)配列がPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンの抗原認識に重要であった。ExDK配列をもつE3BP 34-47番ならびにOGDC-E2 100-113番もT細胞エピトープであることが判明した。また我々が樹立したPBC患者由来のCD4陽性T細胞クローンはサイトカイン産生パターンからTh1タイプであった。

2. PBC患者より樹立したPDC-E2反応性T細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性

PBCで特徴的に出現する抗核抗体の対応抗原(gp210、p62、lamin B receptor、Sp100抗原など)から、ExDK配列あるいはEIExD配列に類似の配列をもつ部分を多数合成ペプチドとして作成した。このうちgp210抗原の一部にPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンが交差反応性を示すことから、ミトコンドリア抗原とgp210抗原との間に共通の抗原認識機構が存在する可能性が示唆された(図2)。

3. PBC患者、および健常者から樹立されるPDC-E2反応性T細胞クローンの質的差異についての検討

PBC患者由来のPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンの多くは、L-DR53をAPCに用いた場合抗原を認識した。しかし健常者由来のT細胞クローンの多くはB7分子を代表とする側副刺激分子を欠いたL-DR53をAPCとした場合抗原を認識しなかった(表1、図3)。

4. 抗原提示された後のT細胞クローンについての検討

L-DR53あるいはBECをAPCとした時に反応性

を失ったT細胞クローンを回収して、PBMCをAPCとして再刺激をしても増殖性を失っていたことから、anergy状態に陥ったと考えられた。L-DR53をAPCとした場合増殖するT細胞クローンはanergyに陥ることはなかった(図4)。

5. PBMC、あるいはL-DR53を抗原提示細胞に用いた場合のPDC-E2反応性T細胞の頻度

PBC患者のPDC-E2 163-176反応性T細胞の頻度を限界希釈法にて算出した結果、限界希釈法で用いるAPCをPBMCにした場合、 10^7 個の末梢血中に2.5個-5個の頻度でPDC-E2 163-176反応性T細胞は存在した。健常者でのPDC-E2 163-176反応性T細胞の頻度はそれにやや劣るものながらほぼ同様であった。しかし限界希釈法で用いるAPCをL-DR53にした場合、健常者での自己抗原を認識する末梢T細胞の頻度は検出限度以下となった(図5)。このことから健常者では自己抗原に反応できる末梢T細胞は生体内で存在するが、抗原認識の際には多くの場合側副刺激分子を必要とすると考えられた。

D. 結論

- (1)PBC患者から自己抗原PDC-E2 163-176反応性T細胞クローンが樹立できた。
- (2)PBCに出現する自己抗原PDC-E2反応性T細胞クローンの一部は自己抗原gp210にも交差反応性を示した。
- (3)PDC-E2反応性T細胞クローンは側副刺激分子を増殖に必要とするものと必要としないものに二分された。
- (4)側副刺激分子を必要とするT細胞クローンは、側副刺激分子のない抗原提示でAnergy状態へ陥った。
- (5)PBC患者で出現する自己抗原PDC-E2反応性T細胞は側副刺激分子を増殖に必要としないものが多く、健常者で出現するT細胞は側副刺激分子を増殖に必要とするものが多かった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamihira T, Shimoda S, Harada K, Kawano A, Handa M, Baba E, Tsuneyama K, Nakamura M, Ishibashi H, Nakanuma Y, Gershwin ME, Harada M: Distinct costimulation dependent and independent autoreactive T-cell clones in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Nov;125(5):1379-87

2) Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Kawano A, Kamihira T, Sakamoto N, Matsushita S, Tanaka A, Worman HJ, Gershwin ME, Harada M: Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003 Jun;124(7):1915-25

2. 学会発表

- 1) 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、半田瑞樹、石橋大海、林田一洋：PBCにおけるCD28陰性CD4陽性T細胞の頻度及び同T細胞の胆管上皮細胞との相互作用について、第39回日本肝臓学会総会
- 2) 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、半田瑞樹、石橋大海、林田一洋：原発性胆汁性肝硬変(PBC)におけるCD4+CD25+regulatory T cellの検討、第39回日本肝臓学会総会
- 3) 下田慎治、上平幸史、河野聡、半田瑞樹、中村稔、石橋大海：原発性胆汁性肝硬変の自己抗原反応性T細胞のCD28分子発現について、第39回日本肝臓学会総会
- 4) 上平幸史、下田慎治、中村稔、河野聡、半田瑞樹、石橋大海、林田一洋：ヒト肝内胆管上皮細胞(HIBEC)のT細胞に対する抑制作用、第39回日本肝臓学会総会
- 5) 下田慎治、河野聡、上平幸史、半田瑞樹、中村稔、原田実根：原発性胆汁性肝硬変(PBC)患者より樹立した自己抗原反応性T細胞クローンの形質転換の可能性、第33回日本免疫学会総会
- 6) 河野聡、下田慎治、上平幸史、半田瑞樹、東みゆき、原田実根：原発性胆汁性肝硬変(PBC)の発症にかかわるB7分子の影響、第33回日本免疫学会総会
- 7) The Liver Meeting-54th AASLD Annual Meeting
HOW IS THE LOSS OF TOLERANCE TO MITOCHONDRIAL AUTOANTIGENS SUSTAINED IN PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS?
Shinji Shimoda, Takashi Kamihira, Hiromi Ishibashi, Minoru Nakamura, M. Eric Gershwin

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1. PBC患者由来のPDC-E2 163-176反応性T細胞クローンの性状

TCC	derived from	costimulation-dependency	CD28 expression
HT7	patient	independent	-
RS9	patient	independent	-
RS5	patient	independent	+
RS12	patient	independent	+
MN3	HS	independent	+
MN5	HS	independent	+
HH1	HS	independent	+
HK15	patient	dependent	+
HK14	patient	dependent	+
TM1	patient	dependent	+
TY1	patient	dependent	+
MN29	HS	dependent	+
IY46	HS	dependent	+
IY65	HS	dependent	+
TTC9	HS	dependent	+
TTC13	HS	dependent	+
TTC16	HS	dependent	+
TTC29	HS	dependent	+

図1. PBC-E2 163-176反応性T細胞の抗原特異性

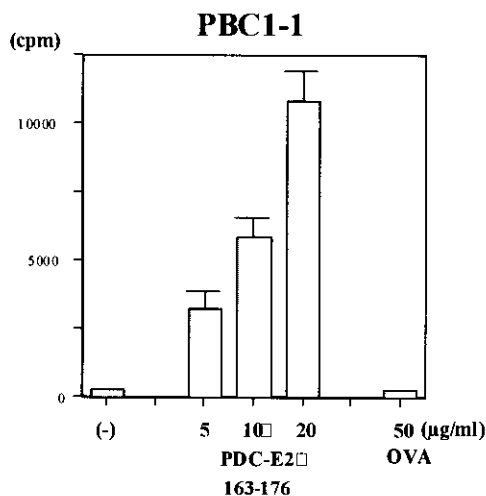


図 2. PBC 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞の PDC-E2 抗原に対する反応

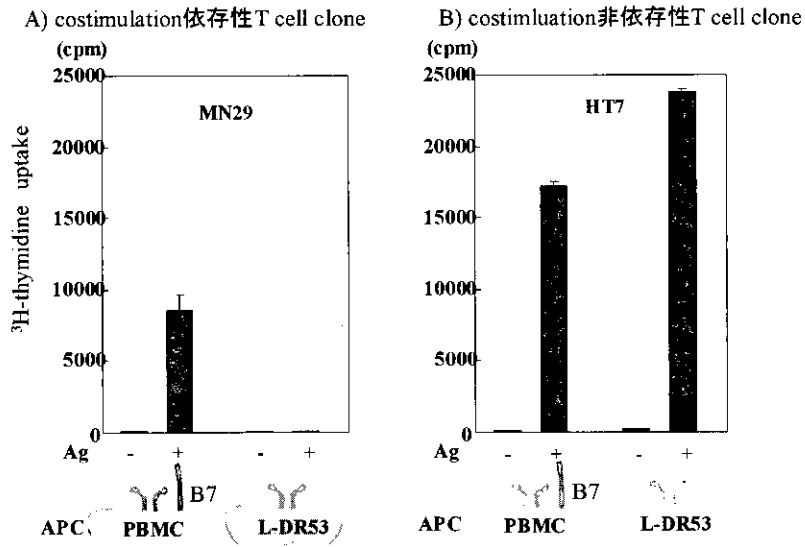


図 3. PDC-E2 反応性 T 細胞クローンの抗核抗体対応抗原との交差反応性

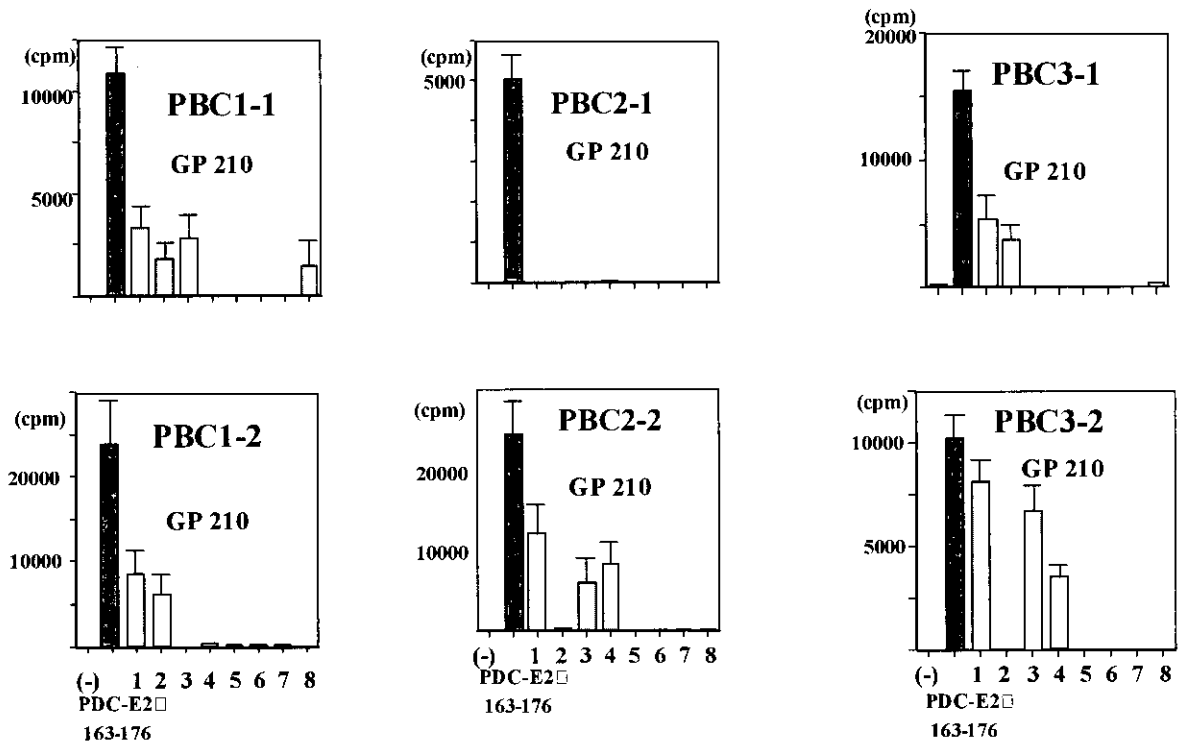


図4

胆管上皮細胞との接触後のT cell cloneの状態

A) costimulation依存性T cell clone

B) costimulation非依存性T cell clone

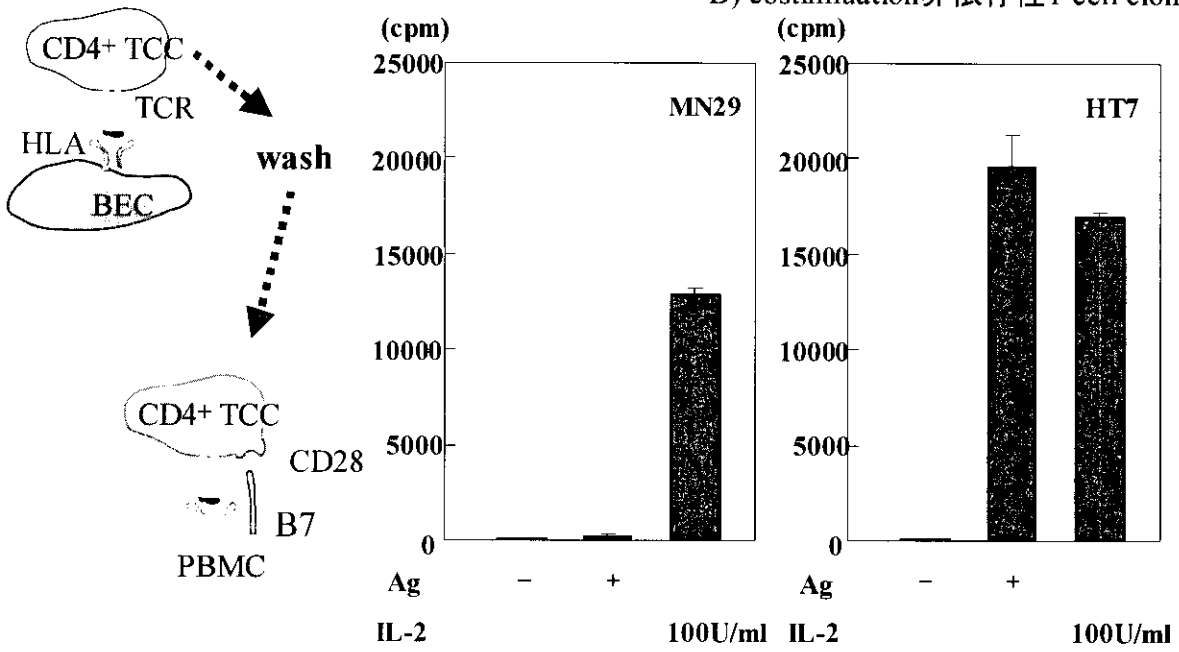
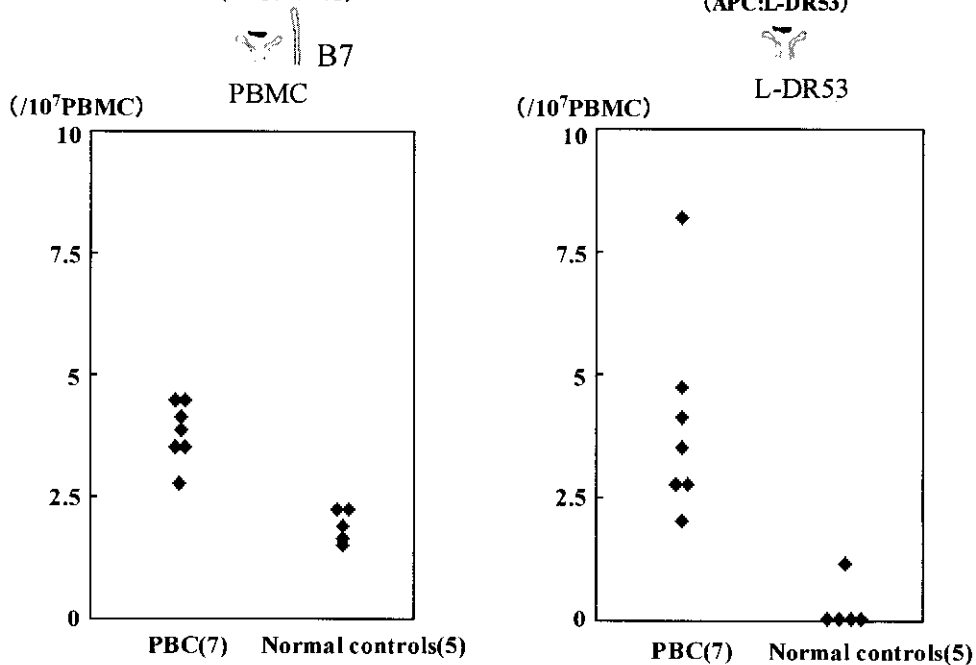


図5

costimulation非依存性PDC-E2反応性CD4+T cellの頻度

A) PDC-E2反応性 CD4+T cell (APC:PBMC)

B) costimulation非依存性 PDC-E2反応性CD4+T cell (APC:L-DR53)



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

自己免疫性肝疾患における細胞性免疫応答の解析に関する研究

分担研究者 喜多 宏人 自治医科大学消化器内科 助手

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変（PBC）に対する免疫療法を開発することを目的に、PBC患者末梢血より自己抗原特異的T細胞を誘導し、誘導された自己抗原特異的T細胞の機能を解析した。又、自己抗原がどのような過程でプロセッシングを受けるのかを解析した。又、PBC患者末梢血のNK T細胞の頻度を解析した。PBC患者末梢からCD8陽性で自己抗原であるPDC-E2抗原を特異的に認識する自己抗原特異的T細胞特異的が誘導可能であった。自己抗原特異的CD8陽性T細胞は抗原特異的な細胞傷害性活性を示した。自己抗原が自己抗体と免疫複合体を形成し、特異的レセプターを介して樹状細胞に取り込まれる過程には、細胞質内のプロテアソームの作用が必要であることが証明された。PBC患者末梢血のNK T細胞は健常人と比較して、頻度が減少していた。PBCの発症に自己抗原特異的CD8 T細胞やNK T細胞等の細胞性免疫応答が密接に関連していることが明らかになり、今後これらの細胞とPBCの病態との関連を更に明らかにして行くとともに、自己抗原特異的T細胞やNK T細胞を操作することによる治療法の開発に向けて研究を進めてゆく必要がある。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）における細胞性免疫応答を解析することにより、自己抗原特異的T細胞やNK T細胞を標的としたPBCに対する免疫療法を開発する。

B. 研究方法

PBC患者末梢血より自己抗原特異的T細胞を誘導し、誘導された自己抗原特異的T細胞の細胞障害性機能やサイトカイン産生性機能を解析する。又、自己抗原刺激に応じて自己抗原特異的T細胞が誘導される過程で、抗原がどのような過程でプロセッシングを受けるのかを解析する。PBC患者末梢血のNK T細胞の頻度を解析する。

C. 研究結果

PBC患者末梢血中にはCD8陽性で自己抗原であるPDC-E2抗原を特異的に認識する自己抗原特異的T細胞が存在し、抗原刺激に伴い特異的に誘導可能であった。自己抗原特異的CD8陽性T細胞は抗原特異的な細胞傷害性活性を示した。自己抗原が自己抗体と免疫複合体を形成し、特異的レセプターを介して樹状細胞に取り込まれる過程には、細胞質内のプロテアソームの作用が必要であることが証明された。PBC患者末梢血のNK T細胞は健常人と比較して、頻度が減少していた。

D. 考察

PBCの発症に自己抗原特異的CD8 T細胞やNK T細胞等の細胞性免疫応答が密接に関連していることが明らかになった。今後、PBCの病態との関連を更に明らかにして行くとともに、自己抗原特異的T細胞やNK T細胞を操作することによる治療法の開発に向けて研究を進めてゆく必要がある。

E. 結論

PBCの病態に自己抗原特異的CD8 T細胞やNK T細胞が密接に関連していることが明らかにされ、十抗原の抗原提示されるためにプロセッシングを受ける機序の一部があきらかにされた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhe-Xiong Lian, Tomoyuki Okada, Xiao-Song He, Hiroto Kita, Yong-Jun Liu, Aftab A. Ansari, Kentaro Kikuchi, Susumu Ikehara, and M. Eric Gershwin ; Heterogeneity of Dendritic Cells in the Mouse Liver: Identification and Characterization of Four Distinct Populations

- The Journal of Immunology 170; 2323-2330, 2003
- 2) Hiroto Kita, Xiao-Song He, M. Eric Gershwin ; Application of Tetramer Technology in Studies on Autoimmune Diseases, Autoimmunity Review 2; 43-49, 2003
 - 3) Hiroto Kita, Aftab A. Ansari, Xiao-Song He, Zhe-Xiong Lian, Judy Van de Water, Ross L. Coppel, Velimir Luketic, Marshall Kaplan, Hideaki Inamori, Norio Isoda, Kentaro Sugano, Michio Imawari, and M. Eric Gershwin ; Proteasome is Required for Class I-restricted Presentation by Fc γ Receptor-Mediated Endocytosis in Primary Biliary Cirrhosis. J of Autoimmunity 21 ; 175-182, 2003
 - 4) Kita H, He XS, Gershwin ME. : Autoimmunity and environmental factors in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Ann Med. 2004; 36(1):72-80.
- 4) 喜多宏人, Olga V. Naidenko, Mitchell Kronenberg, Aftab A. Ansari, Paul Rogers, Xiao-Song He, Frits Koning, Toshifumi Mikayama, Judy Van de Water, Ross L. Coppel, 稲森英明、小野和則、磯田憲夫、井戸健一、菅野健太郎、Marshall Kaplan, and M. Eric Gershwin : 原発性胆汁性肝硬変患者末梢血及び肝臓内に存在するNKT細胞のヒトCD1dテトラマーを用いた解析、第53回日本肝臓学会総会、2003年5月22日
 - 5) 喜多宏人、M. Eric Gershwin : 原発性胆汁性肝硬変における樹状細胞の自己抗原提示機序(講演)、第14回The meeting of Liver and Immunology、2003年9月6日
 - 6) 喜多宏人、M. Eric Gershwin : 原発性胆汁性肝硬変におけるCD8陽性自己反応性T細胞の活性化を抗原特異的に阻害するT細胞受容体アンタゴニズムの解析、DDW-Japan 2003シンポジウム3、肝疾患治療への免疫学の挑戦 2003年10月15日

2. 学会発表

- 1) 喜多宏人: 原発性胆汁性肝硬変における細胞障害性T細胞応答(講演)、第29回肝臓研究会、2003年1月18日
- 2) 喜多宏人: 原発性胆汁性肝硬変における自己抗原特異的細胞障害性T細胞(講演)、第10回自己抗体と自己免疫シンポジウム、2003年3月8日
- 3) 喜多宏人, Aftab A. Ansari, Xiao-Song He, Zhe-Xiong Lian, Judy Van de Water, Ross L. Coppel, Marshall Kaplan, 稲森英明、小野和則、磯田憲夫、井戸健一、菅野健太郎、and M. Eric Gershwin : PROTEASOME IS REQUIRED FOR CLASS I-RESTRICTED PRESENTATION OF EXOGENOUS AUTOANTIGEN ACQUIRED BY FC γ RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS BY HUMAN DENDRITIC CELLS, 第89回日本消化器病学会総会、2003年4月26日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Th1/Th2 バランス制御法の開発：インバリアント NKT 細胞亜分画による制御

分担研究者 松下 祥 埼玉医科大学免疫学 教授

研究要旨: Th1/Th2 バランスは臓器特異的な自己免疫疾患の病態や治療を考える上で重要であり、樹状細胞 (DC) は Th1/Th2 分化に重要な影響を与える細胞の一つである。一方、種々の免疫疾患において、特定のインバリアント NKT (iNKT) サブセットの減少が認められ、これらの疾患の病因、病態に深く関与していることが示唆されている。しかし、ヒトにおいて iNKT サブセットのバランスが、Th1/Th2 バランスを支配する詳細な機序については明らかにされていない。本研究では、iNKT 細胞サブセットのバランスが、末梢における Th1/Th2 応答バランスを制御する重要な要因となり得ることを明らかにした。

A. 研究目的

インバリアント NKT (iNKT) 細胞は、T 細胞抗原受容体 (TCR) を介した抗原刺激により IFN- γ 、および IL-4 を短時間に大量に産生することから、免疫応答の初期における重要な免疫制御機構を担っていると考えられている。

ヒト iNKT 細胞 (V \cdot 24-J \cdot 18) は、CD4⁺、CD8⁺、および CD4⁻CD8⁻ (double negative: DN) の3つのサブセットから構成されており、それぞれ異なるサイトカイン産生性を有している (Takahashi T. et. al., J. Immunol. 2002; 168: 3140)。近年、全身性強皮症 (Sumida T. et. al. J. Exp. Med. 1995; 182:1163)、1 型糖尿病 (Wilson SB. et. al. Nature 1998; 391: 177)、などの自己免疫疾患、およびアトピー性皮膚炎 (Oishi Y. et. al. Clin. Exp. Immunol. 2000; 119:404., Takahashi T. et. al. Hum. Immunol. 2003; 6: 586) などのアレルギー性疾患の患者群において、特定の iNKT サブセットが減少していることが報告され、これらの疾患の病因、病態に深く関与していることが示唆されている。しかし、ヒトにおいて iNKT サブセットのバランスが、Th1/Th2 バランスを支配する詳細な機序については明らかとされていない。

本研究では、異なる iNKT サブセットにおける、DC を介した免疫応答制御機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. ヒト iNKT 細胞株の樹立

健康人末梢血単核細胞 (PBMCs) より、抗ヒト TCRV α 24 抗体、FITC マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて TCRV α 24 陽性細胞

を分離した。これを α -galactosylceramide (α -GalCer; 10 ng/ml) を抗原として、7 日おきに複数回刺激することにより、 α -GalCer 特異的ヒト iNKT 細胞株を樹立した (図 1 A, B, C)。さらに CD4 マイクロビーズ、抗ヒト CD8 \cdot 抗体、および FITC マイクロビーズを用いて、CD4⁺ iNKT、DN iNKT の各サブセットを分離精製した。分離した各 iNKT 細胞サブセットはフローサイトメトリーにより確認を行った (図 2)。

また、各 iNKT 細胞サブセットが産生するサイトカインは、ELISA 法により定量した (ENDOGEN)。

2. モノサイト (Mo)-DC の誘導

PBMCs より、抗ヒト CD14 マイクロビーズを用いて CD14 陽性細胞を分離し、IL-4 (100 U/ml)、GM-CSF (100 ng/ml) で 5 日間培養したものをモノサイト由来樹状細胞 (Mo-DC) として用いた (図 1A)。

3. Mo-DC におけるサイトカイン産生性、および表面分子の発現の評価

48 穴平底プレート 1 穴につき、 α -GalCer (20 ng/ml) 添加および無添加の Mo-DC (3×10^5) と、各サブセットの iNKT 細胞株 (6.0×10^4) を共培養した。その際、 α -GalCer による iNKT 細胞の活性化に引き続く新たな蛋白合成を阻害する目的で iNKT 細胞をエメチンで処理したのもを用いた (90 mg/ml; Matsuoka, et. al., J. Immunol. 2001; 166: 2202-2208)。陽性コントロールの刺激として、LPS (1 μ g/ml)、TNF- α (50 ng/ml) を用いた。24 時間後上清を回収し、上清中の IL-12 を ELISA 法により定量した (ENDOGEN)

(図 4A)。

表面分子の発現は、抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD83 抗体、および抗ヒト CD86 抗体 (Pharmingen) を用いてフローサイトメトリーにより解析した (図 4A)。

4. DC のアロ (同種異系) 反応誘導活性の評価

96 穴丸底プレート 1 穴につき、Mo-DC (1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、および Mo-DC なし) と、各サブセットの $V\alpha 24$ iNKT 細胞 (2.0×10^3) を共培養した。16 時間培養後、放射線照射 (45Gy) し、アロナイーブ $CD4^+$ T 細胞 (3.0×10^4) を加え、共培養を行った。5 日後に ^3H -チミジンをパルス、さらに 8 時間後に ^3H -チミジンの取り込みを定量し、増殖応答を評価した。陽性コントロールの刺激として、LPS ($1 \mu\text{g/ml}$)、TNF- α (50 ng/ml)、リコンビナントヒト CD40L 蛋白 ($5 \mu\text{g/ml}$) (R&D systems) を用いた (図 6A)。

5. Th1 / Th2 分化の評価

48 穴平底プレート 1 穴につき、DC (2×10^5) と、 4.0×10^4 各サブセットの iNKT 細胞を共培養した。16 時間培養後、放射線照射 (45Gy) し、アロナイーブ $CD4^+$ T 細胞 (6.0×10^5) を加え共培養した。6 日後に $CD4^+$ T 細胞を回収し、96 穴平底プレートにて、固相化抗ヒト CD3 抗体と可溶性抗ヒト CD28 抗体によって刺激した。24 時間後上清を回収し、上清中の IFN- γ および IL-4 を ELISA 法により定量した (ENDOGEN) (図 7A)。

C. 研究結果

1. $CD4^+$ iNKT 細胞、DN iNKT 細胞のサイトカイン産生性の評価

α -GalCer (100 ng/ml) を添加した CD1 遺伝子安定発現型 C1R 細胞株、あるいは HeLa 細胞株 (図 3A) および Mo-DC (図 3B) を抗原提示細胞として、それぞれのサブセットの $V\alpha 24$ iNKT 細胞株を刺激し、16 時間後、IFN- γ 、IL-4、IL-10 産生性の評価を行った。その結果、各サブセットの $V\alpha 24$ iNKT 細胞株は、CD1d 拘束性に IL-4、IFN- γ を産生したが、 $CD4^+$ iNKT 細胞株のみに、IL-10 の産生が認められた (図 3)。

2. $CD4^+$ iNKT 細胞、DN iNKT 細胞が、Mo-DC の成熟に及ぼす影響の評価

48 穴平底プレート 1 穴につき、Mo-DC (3.0×10^5) と各サブセットの iNKT 細胞株 (6.0×10^4) を 24 時間共培養し、Mo-DC の IL-12 産生性を評価した。その結果、 α -GalCer+Mo-DC+iNKT

では IL-12 の産生が認められた。特に、活性化 $CD4^+$ iNKT 細胞株と共培養した Mo-DC は、LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) 刺激のものの 2 倍近くの IL-12 を産生した (図 4B)。

さらに、ヒト樹状細胞の成熟マーカーである CD83 分子および CD86 分子の発現を評価したところ、 α -GalCer 添加の有無、および iNKT 細胞株のエメチン処理の有無に関らず、各サブセットの iNKT 細胞株と共培養を行った Mo-DC は、無刺激の Mo-DC に比較して、CD83 分子、および CD86 分子の発現上昇を認めた。特に CD86 分子の発現は、無刺激の Mo-DC の 2 倍以上の上昇を認めた。さらに、 α -GalCer 添加 / エメチン未処理の各サブセットの iNKT 細胞株と共培養された Mo-DC は、CD86 分子の強い発現上昇 (MFI 300 以上) を示し、LPS 刺激された Mo-DC とほぼ同等の成熟を示した (図 5A, B)。

3. アロ反応性に及ぼす影響の評価

Mo-DC : ナイーブ $CD4^+$ T = 1:3、1:30、1:300、および、Mo-DC なしの各割合でアロ反応性を評価したところ、Mo-DC : ナイーブ $CD4^+$ T = 1:3 では、異なる iNKT サブセット間でアロ反応性に及ぼす影響に有意な差を認めなかった。しかし、Mo-DC : ナイーブ $CD4^+$ T = 1:30 では、DN iNKT / α -GalCer 添加 Mo-DC は、著しくアロ反応性を抑制した。さらに、このエメチン処理のものでは、アロ反応抑制活性は消失していた。また、DN iNKT / α -GalCer 無添加 Mo-DC は、アロ反応抑制活性は示さなかった (図 6B)。DN iNKT 細胞のアロ反応抑制効果は、エメチン処理により消失することから、抗原特異的な刺激を受けて新たに合成される蛋白が、抑制性 DC の分化に影響を与えているものと考えられる。

4. ナイーブ $CD4^+$ T 細胞における Th1/Th2 分化に及ぼす影響の評価

Mo-DC : iNKT = 5:1、Mo-DC : ナイーブ $CD4^+$ T = 1:3 で評価した場合、各 iNKT サブセットと共培養された Mo-DC は、いずれもナイーブ $CD4^+$ T 細胞に IFN- γ 産生を誘導した。しかし、 $CD4^+$ iNKT / α -GalCer 添加 Mo-DC によって刺激されたナイーブ $CD4^+$ T 細胞からの IFN- γ 産生は、 α -GalCer 無添加のものに比べ著しく高かった。一方、DN iNKT / α -GalCer 添加 Mo-DC によって刺激されたナイーブ $CD4^+$ T 細胞からの IFN- γ 産生は、 α -GalCer 無添加のものに比べ低かった。一方、代表的 Th2 サイトカインである IL-4 は、 $CD4^+$ iNKT / α -GalCer 添加 Mo-DC、および

DN iNKT / α -GalCer 添加 Mo-DC によって刺激されたナイーブ CD4⁺ T 細胞より産生された。特に、DN iNKT / α -GalCer 添加 Mo-DC は、IL-4 産生誘導能が著しく高かった (図 7B)。これらの効果は、エメチンによって処理された各 iNKT 細胞サブセットでは消失することから、これらのサブセットが抗原特異的な刺激を受けて新たに合成する蛋白が、DC1/DC2 の分化に大きく影響を与えているものと考えられる。

D. 考察

1998 年、Wilson S. B. らにより、1 型糖尿病の双生児および三胎児では、DN V α 24 iNKT 細胞が著しく減少していることが報告された (Nature 1998; 391: 177)。特に 1 型糖尿病進行性の患者では、DN V α 24 iNKT 細胞は IFN- γ のみを産生し IL-4 を産生しないことから、V α 24 iNKT 細胞からの IL-4 産生の欠如が、Th1 優位な免疫応答を誘導し、1 型糖尿病発症を促進するものと考えられている。

我々は、Th1/Th2 バランスにおける樹状細胞を介した免疫応答制御に、ヒト V α 24 iNKT 細胞の異なるサブセットがどのように関与しているかを、CD4⁺ iNKT、DN iNKT 細胞に分離精製し詳細に解析した。我々のデータは、V α 24 TCR リガンドによって活性化された DN iNKT 細胞サブセットが Mo-DC のアロ MLR 誘導活性を抑制し、なおかつナイーブ CD4⁺ T 細胞を Th2 分化にシフトさせる DC2 を誘導することを示している。したがって、iNKT 細胞サブセットのバランスは、末梢における Th1/Th2 バランスを制御する重要な要因となっている可能性がある。これまでの癌、自己免疫疾患の治療において α -GalCer の投与が試されてきたが、特定の iNKT サブセットを動員することにより、Th1、または Th2 にシフトした有効な応答を起こすことが可能かもしれない。最近、マウスにおいて、 α -GalCer が V α 14 iNKT 細胞の活性化を介して DC の成熟を誘導することが報告されている。一方で、V α 14 iNKT 細胞が免疫寛容誘導性の DC を誘導するという報告もある。また、マウスにおける CD8⁺ iNKT サブセットの存在はこれまでに報告がないため、ヒトにおけるこのサブセットの機能は詳細に解析する必要がある。現在、V α 24 iNKT サブセットが DC 分化に与える影響を、DC における HLA-DR、CD83、CD86、CD40 の発現、および各 V α 24 iNKT サブセットが産生する個々のサイトカインの中和抗体を用いて Mo-DC の分化に及ぼす影響の解析を行っている。

E. 結論

異なるヒト iNKT 細胞のサブセット (CD4/DN) は、DC を介してナイーブ CD4 T 細胞の異なる分化 (Th1/Th2) を誘導する。ヒト iNKT 細胞のサブセットのバランスを制御することにより、Th1/Th2 応答を人為的に制御できる可能性を示唆する。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanimoto, H., Shimoda, S., Nakamura, M., Ishibashi, H., Kawano, A., Kamihira, T., Matsushita, S., Gershwin, M. E. and Harada, M. Promiscuous T cells selected by E. coli antigen in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmunity* 20: 255-263, 2003.
- 2) Shimoda, S., Nakamura, M., Ishibashi, H., Kawano, A., Kamihira, T., Sakamoto, N., Matsushita, S., Tanaka, A., Worman H. J., Gershwin, M. E. and Harada, M. Molecular mimicry of mitochondrial and nuclear autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 124:1915-1925, 2003.
- 3) Meguro, M., Nishimura, F., Ohyama, H., Takashiba, S., Murayama, Y. and Matsushita, S. Ligation of HLA-DR Molecules on Fibroblasts Induces Rantes Expression via c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Pathway. *Cytokine* 22: 107-115, 2003.
- 4) Ohyama H, Takeuchi K, Yamada H, Uemura Y and Matsushita S.: SNPs on IL-12 receptor gene associated with the susceptibility to leprosy. In US-Japan Cooperative Medical Science Program, 38, 105-110, 2003.
- 5) 松下 祥、松岡多香子、大山秀樹: 抗原提示細胞、狩野庄吾、中川武正編:「アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療」, 先端医療技術研究所 (東京) pp22-27、2003
- 6) 松下 祥: 抗原特異的免疫療法。薬事日報臨時増刊 9740 号、8-9、2003
- 7) 松下 祥: 歯周病医療から健康科学への貢献とその展望: 生物学の立場から。ザ・クイ